



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12P 21/00, A61K 38/01</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/15643</p> <p>(43) 国際公開日 1998年4月16日(16.04.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03635</p> <p>(22) 国際出願日 1997年10月9日(09.10.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/287651 1996年10月9日(09.10.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 財団法人 化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE)[JP/JP] 〒860 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号 Kumamoto, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 森河 亘(MORIKAWA, Wataru)[JP/JP] 〒862 熊本県熊本市楠7丁目14-29 Kumamoto, (JP) 宮本誠二(MIYAMOTO, Seiji)[JP/JP] 〒861-11 熊本県菊池郡西合志町須屋2066-8 Kumamoto, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AU, CA, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: <b>FRAGMENTS OF PLASMINOGEN EFFECTIVE IN INHIBITING TUMOR METASTASIS AND GROWTH AND PROCESS FOR PREPARING THE SAME</b></p> <p>(54)発明の名称 腫瘍転移増殖抑制効果を有するプラスミノゲン断片およびその調製方法</p> <p>(57) Abstract Fragments of a plasminogen effective in inhibiting tumor metastasis and growth, a process for preparing the fragments, and a tumor metastasis and growth inhibitor containing the fragments as the active ingredient. The fragments are obtained from the elastase-induced hydrolysis product of Lys-plasminogen obtained by treating a plasminogen with plasmin and preferably have a potent heparin-binding activity. The inhibitor is useful for clinical therapy of solid cancers typified by lung and colon cancers.</p>		

(57) 要約

腫瘍転移増殖抑制効果を有するプラスミノゲン断片、該断片の製造方法及び該断片を有効成分とする腫瘍転移増殖抑制剤を提供する。本発明のプラスミノゲン断片は、プラスミノゲンをプラスミン処理して得られるライスプラスミノゲンのエステラーゼ分解生成物から得られ、好ましくは強いヘパリン結合性を示す。本発明のプラスミノゲン断片を有効成分とする腫瘍転移増殖抑制剤は、肺癌、大腸癌に代表される固形癌等の臨床治療に有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード（参考情報）

AL	アルバニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GW	ギニアビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴス	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		ラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CF	中央アフリカ共和国	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CH	スイス	IT	イタリア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CI	コート・ジボアール	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CM	カメルーン	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KG	キルギスタン	NZ	ニュー・ジーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド		
CZ	チェッコ共和国	KR	大  民国	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	RU	ロシア連邦		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SD	スーダン		

## 明 細 書

腫瘍転移増殖抑制効果を有するプラスミノーゲン断片およびその調製方法

### 技術分野

本発明は、生物学的に活性な新規な血漿蛋白質断片および該蛋白質断片の調製方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、N末端修飾プラスミノーゲンの1種であるライスプラスミノーゲン（Lys-Plasminogen；以下、「Lys-P1g.」と称することがある）のエラスターゼ分解生成物であって、とりわけ高いヘパリン結合性を示す断片を好適な態様とする腫瘍転移増殖抑制効果を有するプラスミノーゲン断片、該プラスミノーゲン断片を主成分とする腫瘍転移増殖抑制剤および該プラスミノーゲン断片の調製方法に関する。本発明によるLys-P1g.のエラスターゼ分解生成物、とりわけ高いヘパリン結合性を示すLys-P1g.断片は、生化学や医学の分野、例えば肺癌、大腸癌に代表される固形癌等の臨床治療の分野において有用である。

### 背景技術

プラスミノーゲンは分子量80,000の血漿蛋白であり、血液の凝固線溶系に関与する酵素プラスミンの前駆体である。プラスミノーゲンは糖蛋白質であるが、糖鎖構造の違いにより約10の等電点の異なる成分が知られている。プラスミノーゲン自体には酵素活性はないが、プラスミン、ウロキナーゼまたはプラスミノーゲンアクチベーターによって限定分解を受けて活性型であるプラスミンに変換され、フィブリン凝塊物を分解する活性を呈するようになる。プラスミノーゲンは、5つのクリングル部分（クリングル1～クリングル5）および活性中心を有するセリンプロテアーゼドメインを含む（図1および図2参照）。プラスミノーゲンはまた、

前記クリングル部分の特性によりリジンと結合することができるため、リジン結合担体を用いて特異的に調製することが可能である。

図1に示すように、プラスミノーゲンは、エラスターゼによって限定分解され、アミノ酸配列の79 Tyrからクリングル3までの部位、クリングル4部位、およびクリングル5を含むセリンプロテアーゼドメインの3つの部位を生成する。これら3つの部位は、それぞれリジン結合部位I (Lysine Binding Site I ; 以下、「LBS-I」と称することがある)、リジン結合部位II (Lysine Binding Site II ; 以下、「LBS-II」と称することがある) およびミニプラスミノーゲン (mini-Plasminogen ; 以下、「mini Pl g.」と称することがある) と呼ばれている (デービッドソン (Davidson J. F.) ら、「ヒトプラスミノーゲンの一次構造 : エラスターゼ触媒特異的限定蛋白加水分解によるリジン結合フラグメントおよび“ミニ” プラスミノーゲン (分子量38,000) の単離 (The primary structure of human plasminogen: isolation of two lysine-binding fragments and "mini"-plasminogen (MW: 38,000) by elastase-catalyzed-specific limited proteolysis)、ラベンプレス (Raven Press)、ニューヨーク、vol. 3、191-209、1978)。

プラスミノーゲンにはN末端にグルタミン酸残基を有するグルプラスミノーゲン (Glu-Plasminogen ; 以下、「Glu-Pl g.」と称することがある) とリジン残基を有するライスプラスミノーゲン (Lys-Plasminogen ; Lys-Pl g.) が知られている。前者はインタクトタイプのプラスミノーゲンであるのに対し、後者は図2に示すように、プラスミノーゲンの活性化の際にプラスミンによってGlu-Pl g.のN末端領域にあるLys 76-Lys 77結合が切断されて生成するものであ

る。なお、L y s - P l g. として知られるものには、上記L y s がN末端アミノ酸であるものの他にV a l、M e t がN末端アミノ酸であるものも検出されている。これらL y s - P l g. とG l u - P l g. とを比較した場合、L y s - P l g. はG l u - P l g. よりもウロキナーゼによる活性化速度が非常に大きく、またL y s - P l g. はG l u - P l g. に比べてフィブリン結合能が大きい等、いくつか異なる性質を有している。この性質の違いは、両プラスミノゲン分子の高次構造の違いによるものと考えられ、特にその分子構造中のクリングル1の空間配置の変化によるものと考えられている（ラーチ（Lerch P. G.）ら、ヒトプラスミノゲンにおける個々のリジン結合部位の局在およびその複合体形成能の研究（Localization of individual lysine-binding regions in human plasminogen and investigations on their complex-forming properties）、Eur. J. Biochem. 107 : 7-13、1980）。

最近、オレイリーらは、ヒトのG l u - P l g. の分解物中のL B S - I に血管新生阻害活性を見出し、この物質が癌の転移後の増殖を抑えることを報告した（オレイリー（O' Reilly M. S.）ら、アンジオスタチン：ルイス肺癌による転移の抑制を媒介する新規な血管新生インヒビター（Angiostatin : a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma）、Cell 79 : 315-328、1994）。本発明者らは、G l u - P l g. をエラスターゼ処理して得られるプラスミノゲンリジン結合部位I（以下、本発明によるライスタイプリジン結合部位I（L y s - L B S - I）と区別するため、「G l u - L B S - I」と称することがある）を用い、彼らの実験に準じて再現実験を行なったが、血管新生阻害効果および転移抑制効果で抑制する傾向はある程度認められるものの、対照群に比べ有意差を認

めるには至らなかった。

上述の問題点に鑑み、本発明者らは、プラスミノーゲンを直接、エラスターゼ処理してG l u-L B S-Iを得る前に、ある種の物質（酵素）によって処理した場合に初めてその活性を発現するという仮説をたてた。そして、この仮説に基づき、プラスミノーゲンをエラスターゼ分解する前にプラスミンによって消化してN末端がリジン残基で始まる分子、すなわちL y s-P l g.を調製し、次にこれをエラスターゼで分解することにより、上記オレイリーらのリジン結合部位I（G l u-L B S-I）とはN末端アミノ酸残基の異なるライスタイプリジン結合部位I（L y s-L B S-I）を調製し、この分子の癌転移増殖に与える影響について検討した。

その結果、驚くべきことに、プラスミノーゲンをプラスミンで分解した分解産物であるL y s-P l g.を出発物質としてエラスターゼ処理して得られるL y s-L B S-Iが強い腫瘍転移増殖抑制効果を有することがわかった。さらに、この腫瘍転移増殖抑制効果を示す物質の本体について検討を加えた結果、L y s-L B S-I中にG l u-L B S-Iには認められない低イオン強度でヘパリン担体に結合し得る断片が含まれていることを見出し、G l u-P l g.がプラスミンの作用によってライス形態（Lys Form）（N末端がリジン残基であるプラスミノーゲン）に変換された後にエラスターゼ分解を受けて生成するL y s-L B S-Iとなって初めて腫瘍転移増殖抑制作用が発揮されるとの知見を得た。さらに、このヘパリンに結合するという性質を利用することで血管新生阻害効果のある断片をヘパリンを結合した担体で効率よく調製できることも見出し、本発明を完成するに至った。

#### 発明の開示

本発明は、L y s-P l g.のエラスターゼ分解生成物であって、とり

わけ高いヘパリン結合性を示す断片を好適な態様とする腫瘍転移増殖抑制効果を有するプラスミノーゲン断片を提供する。

本発明はまた、前記腫瘍転移増殖抑制効果を有するプラスミノーゲン断片の調製方法をも提供する。本発明による調製方法は、以下の工程からなる：①プラスミノーゲンにプラスミン等を作用させてLys-P1g.を生成させる；②Lys-P1g.含有溶液をエラスターゼ処理し、クリングル1からクリングル3を含む断片（Lys-LBS-I）の画分を得る；③得られる画分のうち、ヘパリンに対して強い結合性がある部分を選択し、所望の腫瘍転移増殖抑制効果を有するプラスミノーゲン断片を得る。

本発明はさらに、前記腫瘍転移増殖抑制効果を有するプラスミノーゲン断片を有効成分とする腫瘍転移増殖抑制剤を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、プラスミノーゲンのエラスターゼ分解により得られる生成物を示す模式図である。

図2は、プラスミノーゲンをプラスミンによって限定分解した後にエラスターゼ処理した場合の分解生成物を示す模式図である。

図3は、Lys-LBS-Iの、ヘパリンをリガンドとしたイムノアフィニティークロマトグラフィーでの溶出パターンを示すグラフである。

図4は、Glu-LBS-Iの、ヘパリンをリガンドとしたイムノアフィニティークロマトグラフィーでの溶出パターンを示すグラフである。

図5は、Lys-LBS-Iのヘパリン高結合画分をSDS-PAGE（ゲル電気泳動）で解析した結果を示す図である。

図6は、種々のpHでのLys-LBS-Iのヘパリン結合性を示すグラフである。

図7は、C57BL6/Jマウスを用いたルイス肺癌の肺転移増殖抑制

試験におけるLys-LBS-Iの効果をGlu-LBS-Iと対比して示すグラフである。

図8は、スキッド(SCID)マウスを用いたルイス肺癌の肺転移増殖抑制試験におけるLys-LBS-Iの効果をGlu-LBS-Iと対比して示すグラフである。

図9は、Lys-LBS-Iの高いヘパリン結合性を示す画分の腫瘍転移増殖抑制効果をヘパリン非結合画分と対比して示すグラフである。

#### 発明を実施するための最良の形態

プラスミノゲンのエラスターゼ消化により得られる分解産物を図1に、本発明によるプラスミノゲンをプラスミン、次いでエラスターゼで消化して得られる分解産物を図2にそれぞれ示す。

図1に示すようにプラスミノゲンをエラスターゼによって直接分解した場合は、78Val-79Tyrの部分で限定分解され、N末端がTyrであるクリングル1~3を含む断片(Glu-LBS-I)が遊離する。これに対し、プラスミノゲンをプラスミンによって限定分解した場合は、76Lys-77Lysの部分で限定分解され、N末端がLysで始まるプラスミノゲン(Lys-P1g.)が調製され、次に、これをエラスターゼで切断するとN末端残基がLysのクリングル1~3を含む断片(Lys-LBS-I)が遊離する(図2)。このようにN末端がLysで始まるプラスミノゲン(Lys-P1g.)では79Tyrの部分で切断されずにN末端がLysで始まるLBS-Iが得られるのは、エラスターゼの分解作用を受けるアミノ酸の立体的配置が該N末端側で成立しないためと考えられる。いずれにしても、N末端におけるわずか1、2アミノ酸残基の違いによって、腫瘍転移増殖抑制効果やヘパリンへの結合性が大きく変わってしまうことは興味深いものである。



本発明の腫瘍転移増殖抑制効果を有するプラスミノゲン断片は、L y s - P l g. のエラスターゼ分解によって得られるL y s - L B S - I であり、その中でも特に強力な腫瘍転移増殖抑制効果を奏するのは高いヘパリン結合性を示すものである。L y s - L B S - I は、N末端アミノ酸が77 L y s から始まるクリンゲル1～3より構成され、S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動（P A G E）で分子量38 K d aを示す糖鎖を含まない蛋白質である。これは、他の糖鎖を含むアイソフォームに比べより強いヘパリン結合性を示す。当該断片は中性域での生理イオン濃度（生理条件）ではヘパリンに結合することができないが、環境が酸性に傾いた場合に生理イオン濃度でヘパリンに結合し得る特徴を有する。

ヘパリンは、血漿成分であるアンチトロンビンⅢと結合して血液凝固を抑制する作用を有している。ヘパリンあるいはヘパリン様物質は血管内腔に敷き占められている血管内皮細胞上に広く分布し、血管内の余分な凝固を抑制している。本発明のプラスミノゲン断片の持つヘパリン結合性は、従来考えられているプラスミノゲン（プラスミン）がフィブリン等に結合する際に必要となる例えばリジンとの結合で例示される結合様式の他に、前記血管内皮細胞へ直接結合して何等かの作用を及ぼす可能性を有している。

腫瘍の遠隔転移巣が増殖するためには、腫瘍細胞への栄養分と老廃物を運搬する血管が必要であり、腫瘍の増殖の過程で「新しい血管を形成し、腫瘍へと引き込む（血管新生）」という現象が観察される。新生血管は、腫瘍細胞からのシグナルを受けた既存血管の内皮細胞が既存血管を破壊し、腫瘍細胞へ向かって「増殖」、「伸長」、「管腔の形成」という段階を経て形成される。

それゆえ、このような血管内皮細胞の働きを抑制することによって、遠

隔転移巣の増殖を抑制することが可能であるため、本発明のプラスミノーゲン断片の持つヘパリン結合性は血管内皮細胞の働きに対して抑制作用を及ぼすための必要条件を備えているといえる。

しかしながら、既存の血管も含めて血管はすべて血管内皮細胞で敷き占められているため、正常な血管内皮細胞には影響を及ぼすことなく腫瘍細胞の遠隔転移巣の増殖のみを抑制するためには作用物質を腫瘍細胞の新生血管のみに選択的に結合させることが必要である。ジェイン (Jain, R. K.) らは、腫瘍内の血管は極度に分極化し血流が鬱滞した状態であり、低酸素状態によりその環境は酸性に傾いていることを報告している (ジェインら、固形腫瘍における薬物送達に対するバリアー (Barriers to drug delivery in solid tumors)、Sci. Am. vol. 271 (1) 58-65、1994)。本発明のプラスミノーゲン断片は、前記のように、生理条件 (等張状態) 下ではヘパリンまたはヘパリン様物質に結合することができないが、環境の pH が低下した非生理的な条件下ではヘパリン結合性を獲得するという特性を有する。従って、ジェインらによって報告されているように、腫瘍内のような酸性に傾いた環境下では本発明のプラスミノーゲン断片は腫瘍内のヘパリンやヘパリン様物質に結合し、その結果、腫瘍に対して特異的に作用するものと思われる。

本発明のプラスミノーゲン断片が腫瘍細胞の増殖を抑制する作用機作については不明であるが、その構造を考慮するとプラスミン作用の競合的な阻害によるものではないかと考えられる。

前記したごとく、オレイリーらはプラスミノーゲン断片が、直接、血管内皮細胞の増殖を抑制することを報告している。彼らはルイス肺癌を移植した担癌動物が、強力な血管新生阻害物質をその血中および尿中に産生していることを発見し、この物質を精製してこれをアンジオスタチンと命名

した。該アンジオスタチンはプラスミノーゲンの内部断片と極めて高い相同性を示し、ヒトLBS-I (Glu-LBS-I) を精製したのもも同様の活性を示すことを報告した。前記ヒトLBS-I は分子量38Kda ~ 42.5Kdaを有する3つのアイソフォームを持つ物質であり、本発明のプラスミノーゲン断片と高い相同性を示す点で注目される。

現段階では、本発明のプラスミノーゲン断片とアンジオスタチンが作用機作および物質として同一であるか否かについては明確には断定できない。しかしながら、本発明のプラスミノーゲン断片とアンジオスタチンには、  
①本発明のプラスミノーゲン断片には糖鎖が含まれておらず、糖鎖を含む他のアイソフォームに比べ有意に遠隔転移腫瘍細胞の増殖を阻害すること、  
②本発明のプラスミノーゲン断片はアンジオスタチンほどの血管内皮細胞の増殖抑制効果を奏しないこと等のような物性並びに生物活性において明らかな差異が存在することも事実である。

本発明によってもたらされるプラスミノーゲン断片が有する高度な腫瘍転移増殖抑制効果は、前述のアンジオスタチンとの差異に起因する可能性は否定できない。

本発明のプラスミノーゲン断片を製造する方法は特に限定されないが、例えば、以下の工程からなるものが例示される：①プラスミノーゲンにプラスミン等を作用させてLys-P1g. を生成させる；②Lys-P1g. 含有溶液をエラスターゼ処理し、クリングル1からクリングル3を含む断片 (Lys-LBS-I) の画分を得る；③得られる画分のうち、ヘパリンに対して強い結合性がある部分を選択し、所望の腫瘍転移増殖抑制効果を有するプラスミノーゲン断片を得る。

具体的には、まず血液試料よりプラスミノーゲンを分離し、得られたプラスミノーゲンよりLys-P1g. を調製する。血液由来のプラスミノ

ーゲンの製法としては以下の方法が挙げられる。例えば、代表的な製法としてはリジン担体を用いるアフィニティークロマトグラフィーで精製するドイツ (Deutsch, D. G.) らの方法 (ドイツラ、Science 170: 1095、1970) およびその改変法 (ブロックウェイ (Brockway, W. J.) ら、Arch. Biochem. Biophys. 151: 194、1972) がある。すなわち、新鮮血漿にアプロチニン (20 U/ml)、EDTA (2.5 mM) を加えて混和させた後、リジン担体に結合させ、0.1 M NaCl / 2.5 mM EDTA / 20 Uアプロチニン/ml を含有する緩衝液、さらに界面活性剤を含有する同緩衝液で洗浄した後、6-アミノヘキサン酸で溶出することによって高純度のプラスミノーゲンを調製することが可能である。最終的に精製濃縮を限外濾過膜 (例えば、YM10: アミコン (Amicon) 社製) で行なう。

血中に存在するのは完全分子型のプラスミノーゲンがほとんどであり、そのN末端残基がリジンである Lys-P1g. は僅かしか存在しない。それゆえ、本発明のためには完全分子型のプラスミノーゲンを Lys-P1g. に変換する工程が必要となるが、この変換方法として、プラスミノーゲンにウロキナーゼ<sup>\*</sup>を直接作用させる方法 (ルジュングベルク (Ljungberg, J.) ら、Thromb. Res. 53: 569-576、1989)、プラスミノーゲンにプラスミンを直接作用させる方法 (カステリーノ (Castellino, F. S.) ら、Methods in Enzymology、アカデミックプレス (Academic Press)、ニューヨーク、vol. 80、365、1981)、あるいはプラスミノーゲンを長時間孵置することによる方法 (マークス (Markus, G.) ら、J. Biol. Chem.、vol. 254、1211-1216、1979) 等が挙げられる。本発明においては、好適な方法として、トランスネキサム酸存在下でプラスミノーゲンを孵置し自己消化させて Lys-P

l g. を調製する方法が推奨される。

その後、得られた L y s - P l g. をエラスターゼで分解し、生成する断片より L y s - P l g. のクリングル 1 ~ 3 までを含む分子 (L y s - L B S - I) を回収する。その際、例えばセファデックス G - 7 5 を用いるゲル濾過法およびこれに引き続いて行なわれるリジン-アフィニティークロマトグラフィーによって、良好な L y s - L B S - I の調製が達成される。引続き、得られる L y s - L B S - I を、ヘパリンをリガンドとしたレジンに接触させ結合画分を得ることによって、ヘパリンに強く結合する画分を特異的に調製することができる。

本発明のプラスミノゲン断片すなわち L y s - L B S - I はまた、遺伝子組換え技術に基づき直接産生させることも可能である。すなわち、遺伝子組換え技術により L y s - プラスミノゲン産生細胞を構築し、これより調製される L y s - プラスミノゲンをエラスターゼによって断片化するか、あるいは本発明のプラスミノゲン断片 (L y s - L B S - I) を直接コードする遺伝子を好適なベクター等を用いて真核細胞、哺乳動物細胞または昆虫細胞等適当な宿主細胞に導入して恒常的に所望のプラスミノゲン断片を産生させることにより、L y s - L B S - I を調製することができる。

上述の方法で調製された本発明のプラスミノゲン断片は、活性を最大限に維持するために、新鮮なものを使用するか、あるいは 4℃ で保存する場合には保存後約 5 日以内のものを使用するのが好ましい。本発明のプラスミノゲン断片はまた、ヒトアルブミン、ゼラチン、塩、糖またはアミノ酸などの好適な安定化剤と共に凍結乾燥もしくは液体の状態で保存することができるし、さらには、プラスミノゲン断片溶液を凍結し保存することも可能である。また、感染性夾雑ウイルスの不活性化を目的として、

凍結乾燥もしくは液状の状態において所定の条件下、例えば凍結乾燥状態では65℃で96時間、液状では60℃で10時間の加熱処理を施すことは、薬剤の安全性の観点から極めて好ましい態様である。

本発明のプラスミノゲン断片は、該断片を有効成分として用いて公知の適当な賦形剤と組み合わせることにより、腫瘍転移増殖抑制剤とすることができる。

本発明のプラスミノゲン断片を有効成分とする腫瘍転移増殖抑制剤の有効投与量は、種々の要因、例えば投与対象者の年齢、症状及び重症度などにより変動し、最終的には医師の判断に委ねられるが、一般に成人一日当たり50～500mgの範囲であってよく、望ましくは100～300mgを1～2回に分けて投与するのがよい。投与方法は単回大量(ボラス)あるいは点滴の静脈内投与が最適である。また、場合により他の抗腫瘍剤と併用することも可能であり、本発明で提供される腫瘍転移増殖抑制剤中に前記の抗腫瘍剤を併存させることも好ましい一つの態様である。

以下、本発明の理解を深めるために実施例に沿って説明するが、本発明はこれらの実施例になんら限定されるものではない。なお、以下の実施例に使用した血液由来のプラスミノゲン断片は、マウスでの単回静脈内投与毒性試験、反復静脈内投与毒性試験、一般薬理試験(ビーグル犬を用いた呼吸循環器系に及ぼす影響)、ウイルス不活化試験等によりその安全性が確認されている。

#### 実施例 1

##### (プラスミノゲンの調製)

新鮮凍結プール血漿10Lに、20mMベンツアミジン、1mM PMSF、100U/ml アプロチニン(トラジオール; バイエル社製)を加え、室温で冷融解した。その後、浮遊物を高速遠心機(RS-20IV;

トミー精工社製)で8,000rpm、4℃の条件下にて20分間遠心を行なって除き、上清を得た。上清を、50mMトリス/0.5M NaCl (pH 7.5)で平衡化したリジノーセファロース4Bカラム(内径5.0×30cm;ファルマシア社製)に流速1.0ml/分で通液し、さらに、5倍容の同緩衝液で洗浄した。その後、緩衝液を10mMアミノヘキサ酸を含む同緩衝液に置換し溶出を行なった。溶出液は0.1M炭酸アンモニウム緩衝液に対して4℃で一晩透析した。

### 実施例 2

(Lys-P1g.の調製)

実施例1のクロマトグラフィーの操作で得られる溶出液を濃縮した後、50mMトリス/20mMクエン酸緩衝液(pH 6.5)で一晩透析し、濃縮液に1mMトラネキサム酸を加え、さらに一晩30℃で孵置した。

### 実施例 3

(エラスターゼ-セファロース)の調製

エラスターゼ(ブタ膵臓からのタイプIV;シグマ社製)50mgを、0.5M NaClを含む0.1M炭酸水素ナトリウム溶液に溶解後、さらに一晩4℃で同緩衝液に対して透析した。エラスターゼを固定化するゲルの調製は、CNBr-活性化セファロース4ファーストフロー(Fast Flow)(ファルマシア社製)を用い、その結合は添付の使用説明書に従ってエラスターゼとゲルの割合を5mgエラスターゼ/mlゲルにて行なった。

### 実施例 4

(プラスミノーゲン及びLys-P1g.のエラスターゼ分解物の調製)

実施例1及び実施例2でそれぞれ調製したGlu-P1g.及びLys-P1g.をデービッドソンらの方法(上掲)に従い、実施例3で調製したエラスターゼで分解し、両プラスミノーゲンのエラスターゼ分解物を分

離した。すなわち、精製したG l u - P l g.あるいはL y s - P l g. 10 m g / m l に、アプロチニン100 U / m l (トラジオール; バイエル社製) を加え、0.1 M炭酸アンモニウム溶液に溶解した。これに、エラスターゼ-セファロースを酵素基質比が1 : 100になるように加え、25℃で一晩攪拌させながら反応させた。反応終了後、ガラスフィルターで反応液を濾過し、濾液を0.1 Mで平衡化させたリジナーセファロース(ファルマシア社製)に通液後、同緩衝液で洗浄した。リジナーセファロース結合画分は、20 mMアミノヘキサン酸を含む同緩衝液で溶出した。溶出液は、限外濾過膜(YM-10; アミコン社製)で濃縮し、0.1 M炭酸アンモニウム緩衝液で平衡化したセファデックスG-75カラム(内径5.0×40 cm; ファルマシア社製)に通液し、G l u - リジン結合部位I (G l u - L B S - I)、L y s - リジン結合部位I (L y s - L B S - I) を各々調製した。両L B S - I を凍結乾燥し、使用するまで4℃で保存した。

#### 実施例 5

(ヘパリンとの結合性)

実施例4に示した方法で得られたG l u - L B S - I 及びL y s - L B S - I を、ヘパリンをリガンドとしたイムノアフィニティークロマトグラフィー(ハイトラップヘパリン(Hi trap Heparin) (商品名); ファルマシア社製)に通液し、塩濃度による濃度勾配溶出を行なうことによって得られるヘパリン結合画分の蛋白を吸光度でモニターし、ヘパリンアフィニティー及び量比を比較した。

すなわち、50 mM N a C l を含むトリス緩衝液(pH 7.2)で平衡化したイムノアフィニティーレジン1 m l に、同緩衝液で溶解したG l u - L B S - I (1 m g / m l) 及びL y s - L B S - I (1 m g / m l)



を100 $\mu$ l接触させ、流速0.5ml/分の条件で同緩衝液10mlで洗浄した後、50mM NaCl/トリス緩衝液10ml、1M NaCl/トリス緩衝液(pH7.2)10mlでグラジエント溶出した。

ヘパリンアフィニティーの結果を図3および図4に示す。図3に示すようにLys-LBS-Iはヘパリン非結合画分、中程度結合画分、高結合画分に分かれるのに対して、Glu-LBS-Iは高結合画分に相当する部分が認められなかった(図4)。また、ヘパリンの高結合画分について12.5%のSDS-PAGEを行なった結果、その分子量は38kDa付近であり、糖鎖を含まないLBS-Iの分子量に一致した(図5)。なお、原料となるプラスミノーゲンは平衡化緩衝液組成で溶解せず、同操作は実施できなかった。

#### 実施例 6

(ヘパリン結合性のpHとの関係)

実施例4に示した方法で得られたLys-LBS-Iについて、pH5.0~7.2の範囲における生理食塩濃度でのヘパリンをリガンドとしたイムノアフィニティークロマトグラフィー(ハイトラップヘパリン;ファルマシア社製)を行なうことによってヘパリンへの結合性を調べた。すなわち、150mM NaClを含むクエン酸緩衝液(pH5.0~7.2)で平衡化した前記クロマトレジンを1mlに同緩衝液で溶解したLys-LBS-I(1mg/ml)を100 $\mu$ l接触させ、流速0.5ml/分の条件で同緩衝液10mlで洗浄した後、1M NaCl/クエン酸緩衝液(pH5.0~7.2)10mlで溶出した。

Lys-LBS-Iのヘパリン結合性とpHとの関係を図6に示す。図に示すように、等張条件下で中性付近ではLys-LBS-Iはヘパリンに結合できないが、pHの低下にともない、ヘパリンの結合性は上昇し、

pH 5.0 の条件下で全ての画分がヘパリンに結合した。

#### 実施例 7

(ヒトプラスミノゲンヘパリン結合断片の調製)

実施例 4 で得られる Glu-LBS-I 及び Lys-LBS-I を 50 mM NaCl を含むトリス緩衝液 (pH 7.2) で一晚透析後、実施例 5 のヘパリンアフィニティークロマトグラフィーの操作を行ない、10 mg / ml の濃度のヘパリン結合画分を調製した。また、ハイトラップヘパリン 5 ml に上述のエラスターゼ断片 10 mg / ml を 3 ml 接触させ、2.5 ml / 分の流速で 40 分間洗浄後、1 M NaCl / トリス緩衝液 (pH 7.2) 25 ml でグラジエント溶出し、溶出画分をフラクションコレクター (レディラック ; ファルマシア社製) で分取した。ヘパリン結合画分をプールした後、0.1 M 炭酸アンモニウム緩衝液で透析し、無菌濾過を行なった後、凍結乾燥して動物実験に供した。

#### 実施例 8

(肺転移増殖抑制試験)

癌細胞はルイス肺癌 LL2 (パートラム (Bertram, J. S.) ら、細胞培養に適合させたルイス肺癌細胞のクローン化株の確立 (Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture) : Cancer Lett. vol. 11, 63-73, 1980) を大日本製薬 (株) より購入し、高濃度グルコース-DMEM 培地 / 10% FCS で培養、継代を続けたものを用いた。

30 匹の 6 週令の雄マウス (C57BL6/J) に、ルイス肺癌  $10^7$  細胞 / ml の  $100 \mu$  l を背部皮下に移植し、15~18 日間飼育した。その後、形成された原発巣を術的な操作によって取り除き、皮膚を縫合した。体重及び原発巣の重量を考慮し、マウスを 3 群に分け、14 日間飼育

した後、各群に実施例4で調製したLys-LBS-I 0.5mg/kg、Glu-LBS-I 0.5mg/kg、及び対照群として生理食塩液100 $\mu$ lを毎日10日間、腹腔内投与した。投与終了後、マウスの肺を摘出し、その重量を比較した。なお、統計処理はノンパラメトリック解析を用いた。腫瘍の転移増殖に対するLys-LBS-I、Glu-LBS-Iの効果を図7に示す。対照群（生理食塩液）投与群の肺重量は $0.705 \pm 0.411$ gであるのに対して、Lys-LBS-I投与群の重量は $0.247 \pm 0.05$ gであり、Lys-LBS-Iは有意に癌の転移増殖を抑制していた。一方、Glu-LBS-I投与群は $0.406 \pm 0.186$ gであり、有意差は認められなかった。

#### 実施例 9

（免疫不全動物を用いた肺転移増殖抑制試験）

実施例8の試験について、マウスを免疫不全動物スキッド（SCID）マウスに換え、同様に肺転移増殖を評価した。

異種蛋白の連続投与による免疫の影響を考慮した本実施例のモデルで行なった結果を図8に示す。対照群である生理食塩液投与群、Lys-LBS-I投与群及びGlu-LBS-I投与群の肺重量は、それぞれ $0.522 \pm 0.232$ g、 $0.217 \pm 0.019$ g及び $0.324 \pm 0.152$ gであり、実施例8と同様の結果が得られた。

#### 実施例 10

（ヘパリン結合画分の腫瘍転移増殖抑制効果）

実施例7の方法で調製した、ヘパリン結合画分、ヘパリン非結合画分の腫瘍転移増殖抑制効果を実施例8と同様の方法で評価した結果を図9に示す。対照群（生理食塩液）投与群の肺重量は $0.689 \pm 0.250$ gであるのに対して、ヘパリン結合画分投与群の重量は $0.248 \pm 0.05$ gで

あり、ヘパリン結合画分は有意に癌の転移増殖を抑制していた。一方、ヘパリン非結合画分投与群は $0.515 \pm 0.208$  gであり、有意差は認められなかった。

#### 実施例 11

(ヘパリン結合画分のN末端アミノ酸配列の決定)

実施例7の方法で調製したヘパリン結合画分で12.5% SDS-PAGEを行なった後、定法に従いメンブランにトランスブロットし、得られるバンドの部分を切り出し、N末端アミノ酸配列分析装置（バイオ・アプライド（Bio Applied）社製）を用いて、そのN末端アミノ酸残基を調べた。その結果、当該物質はN末端にLysとValを有する2種類の蛋白質の混合物であり、その比率は1.56～2.3：1の割合であることが判明した。

請 求 の 範 囲

1. ライスタイプリジン結合部位 I。
2. ライスプラスミノーゲンのエラスターゼ分解により得られ、ヘパリン結合性を示し、腫瘍転移増殖抑制効果を有する請求項 1 記載のライスタイプリジン結合部位 I。
3. 糖鎖を含まず、強いヘパリン結合性を示す請求項 2 に記載のライスタイプリジン結合部位 I。
4. プラスミノーゲンよりライスプラスミノーゲンを調製し、該ライスプラスミノーゲンをエラスターゼ処理し、得られた断片よりヘパリン結合性を示す断片を回収することを特徴とする、ライスタイプリジン結合部位 I の製造方法。
5. プラスミノーゲンからのライスプラスミノーゲンの調製を、プラスミノーゲン含有溶液にプラスミンを添加するか、又はトラネキサム酸の存在下にプラスミノーゲンを自然消化させることにより行う、請求項 4 記載の方法。
6. ヘパリン結合性を示す断片の回収を、ライスプラスミノーゲンのエラスターゼ分解生成物含有溶液をヘパリンをリガンドとした担体に通液し、吸着・溶出することにより行う、請求項 4 または 5 記載の方法。
7. 請求項 1、2 又は 3 に記載のライスタイプリジン結合部位 I を有効成分として含有する腫瘍転移増殖抑制剤。

図 1

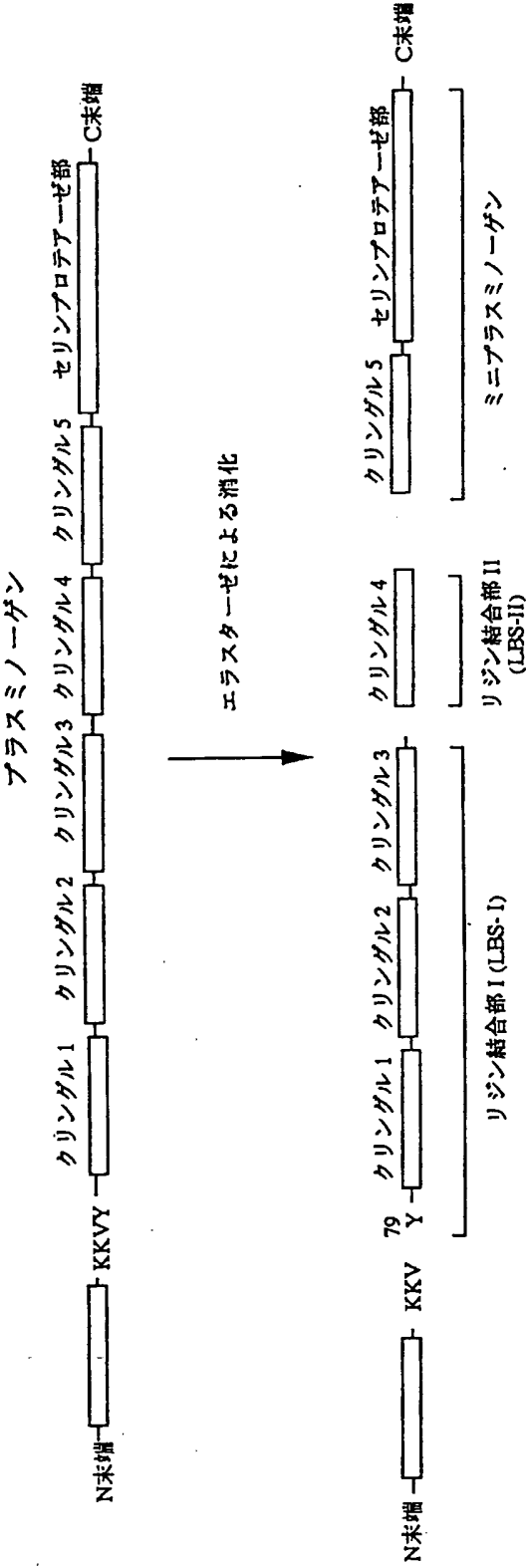


図 2

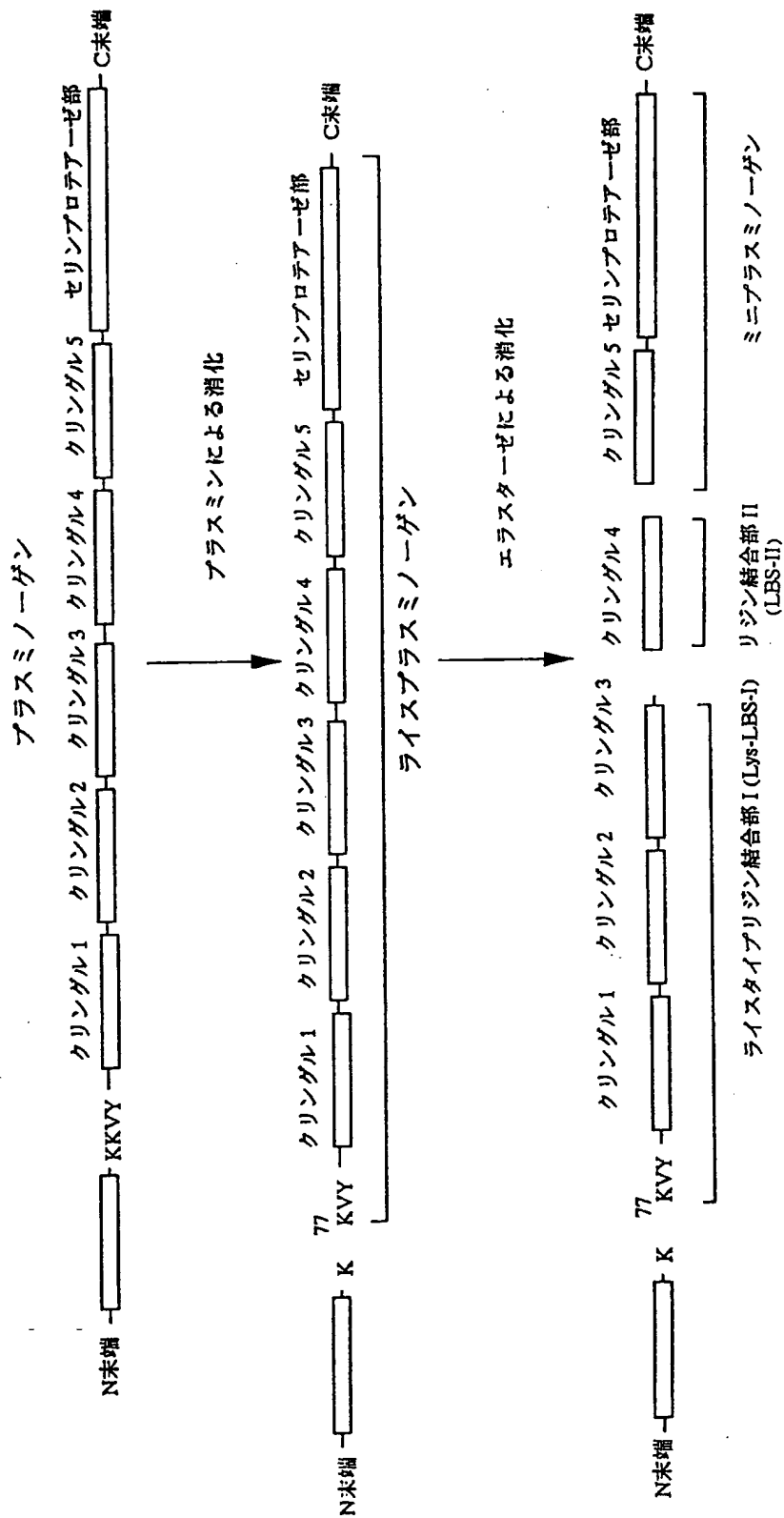


図 3

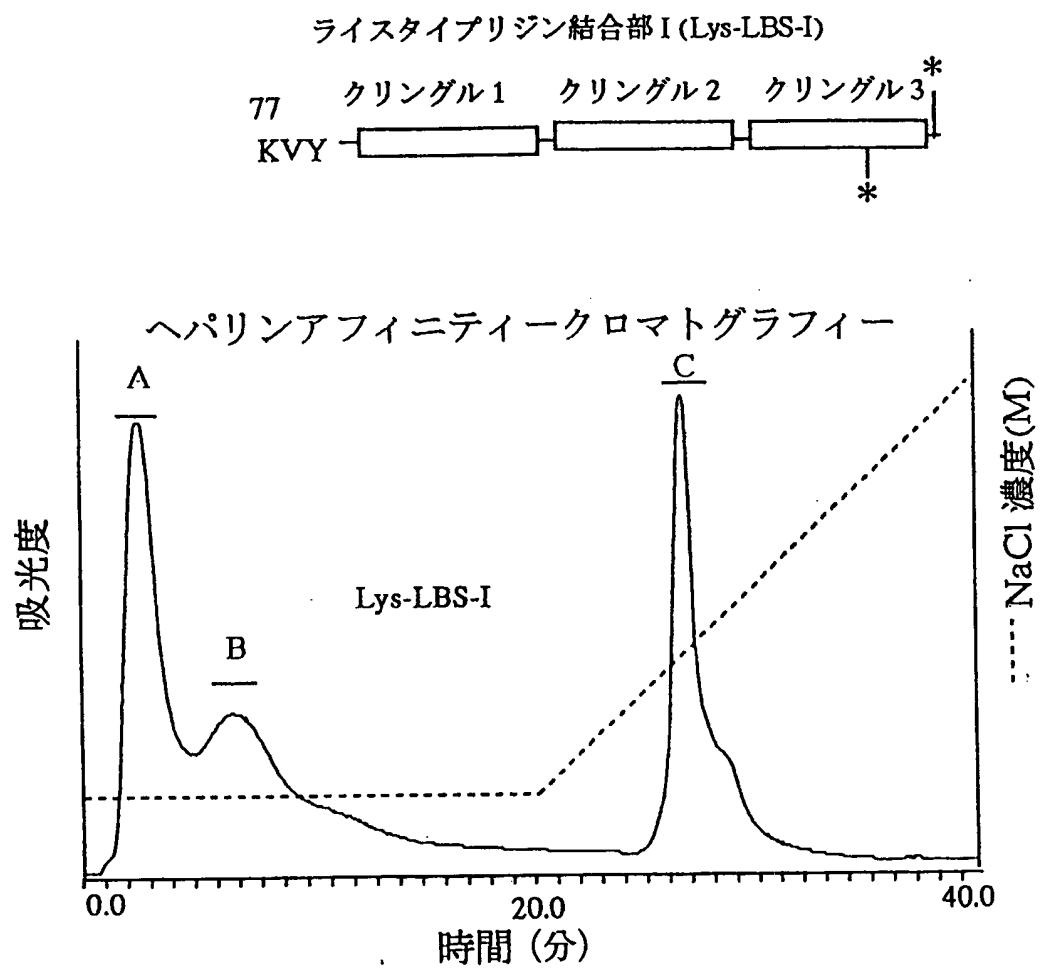




図 4

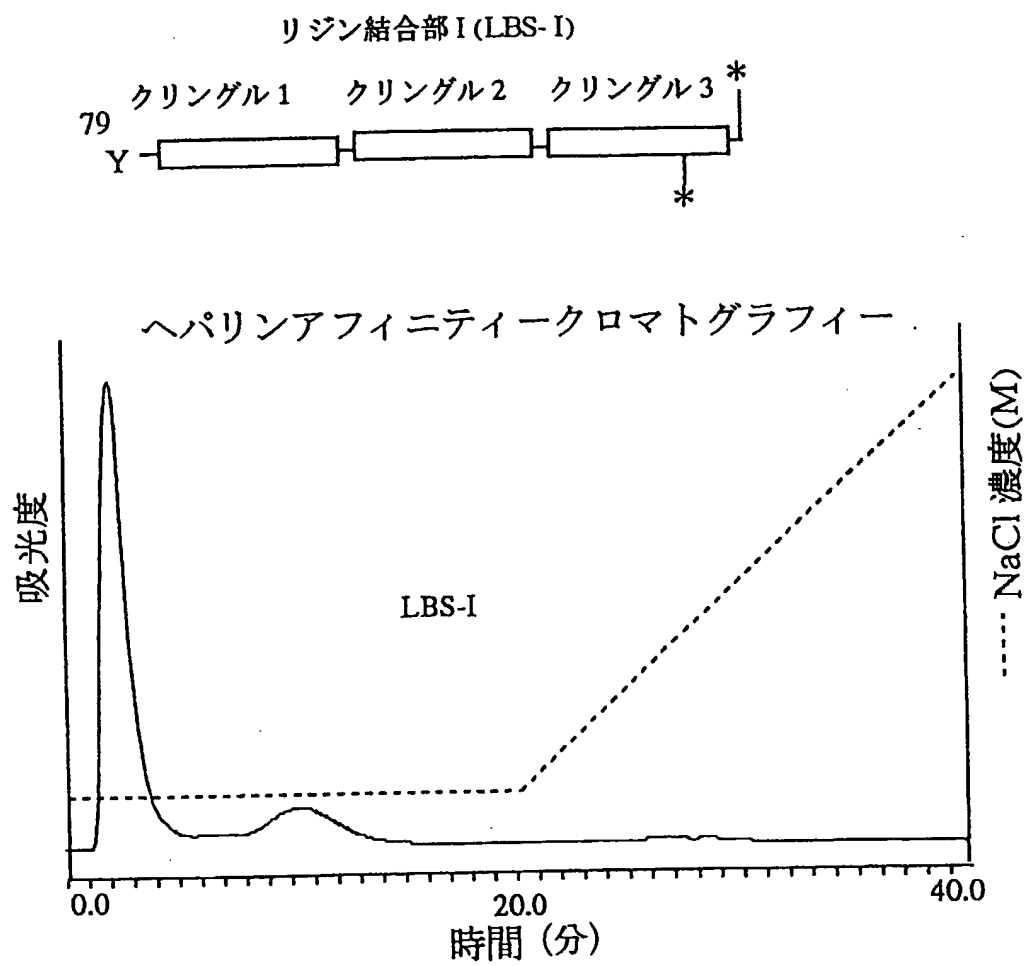


図 5

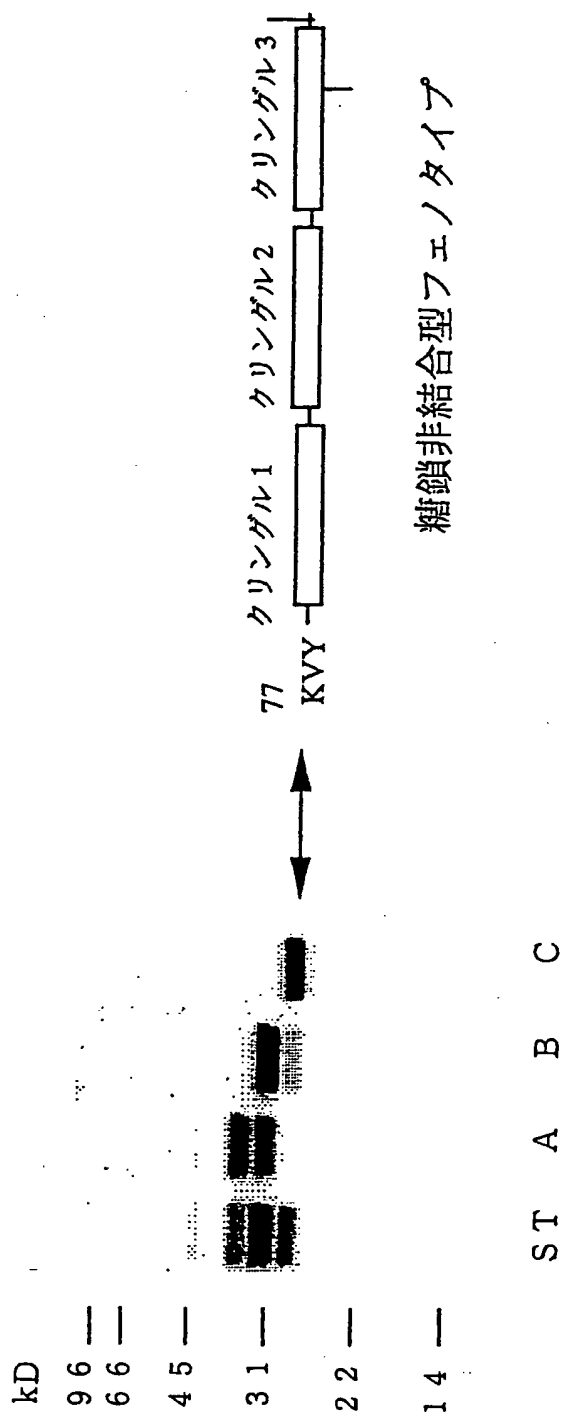


図 6

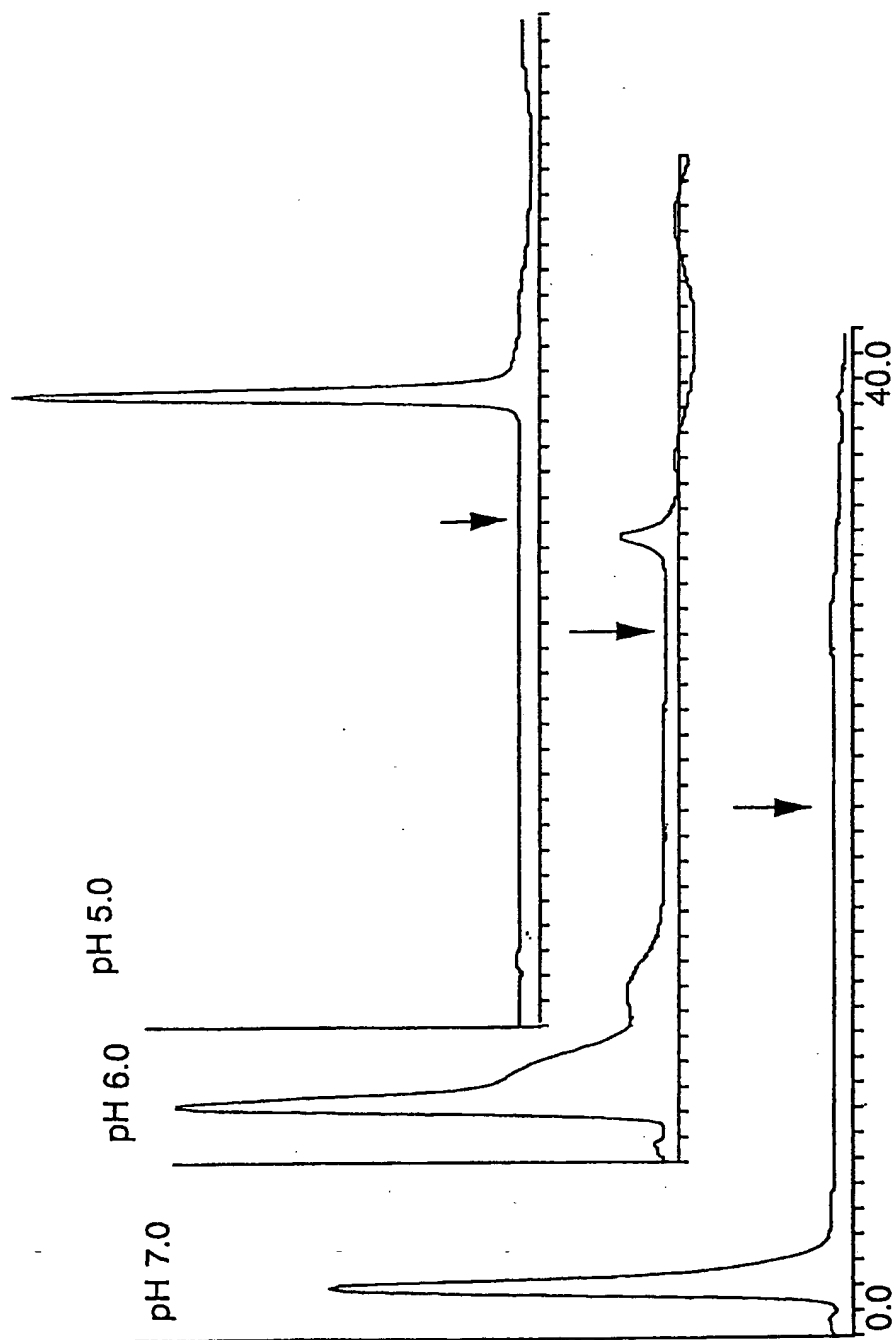


図 7

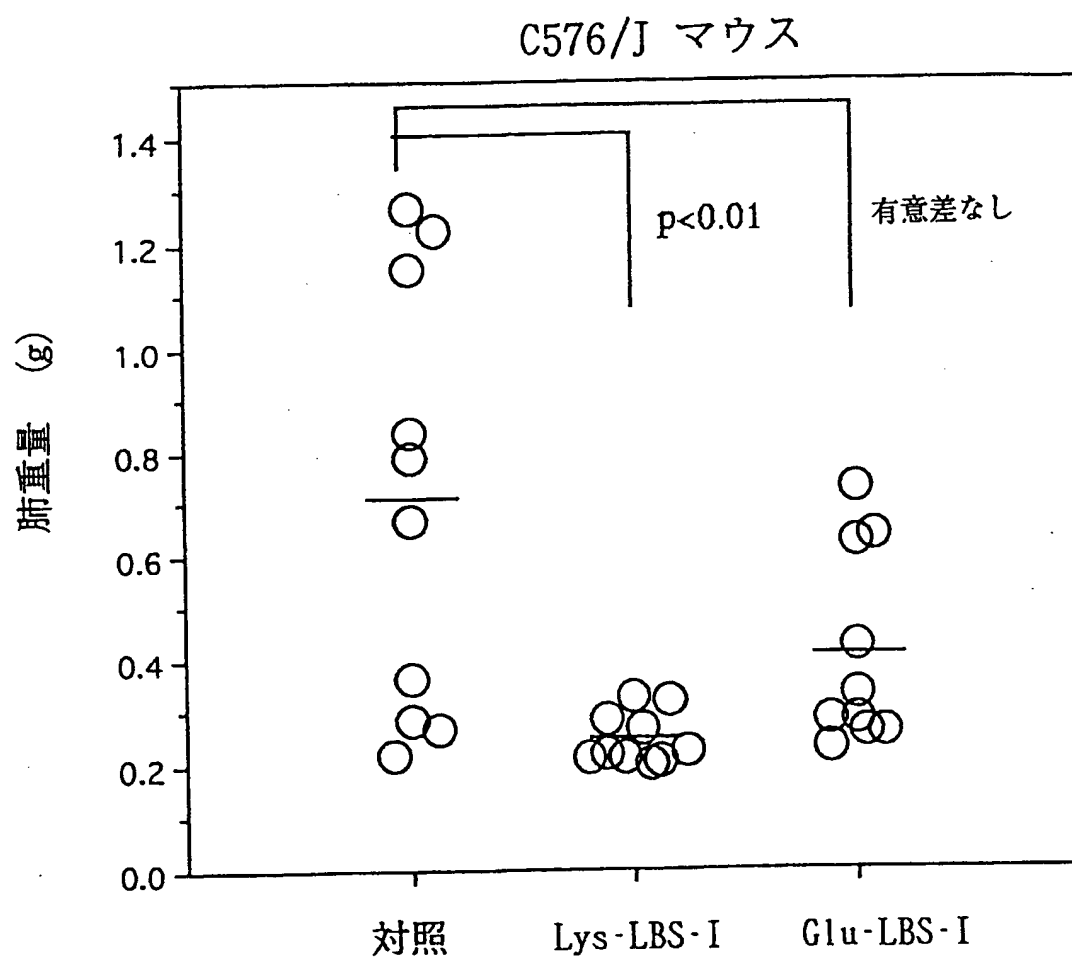


図 8

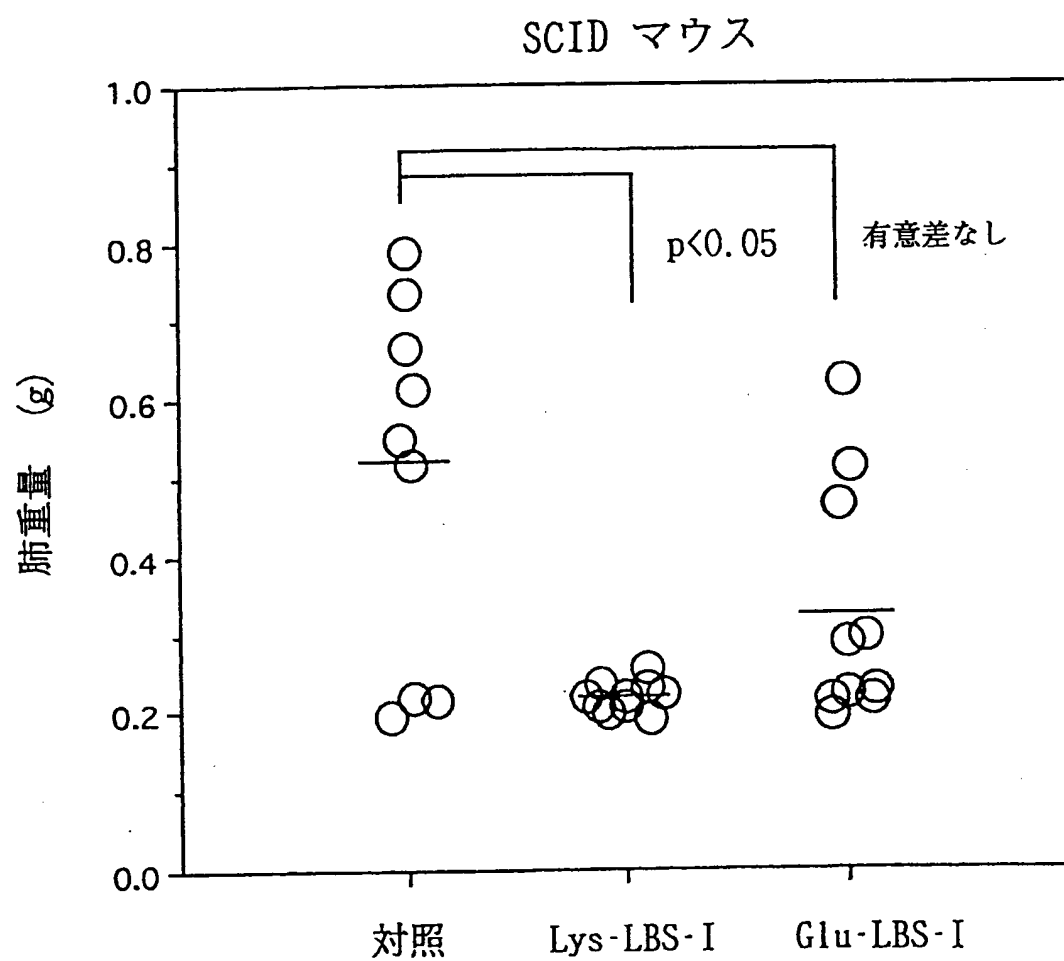
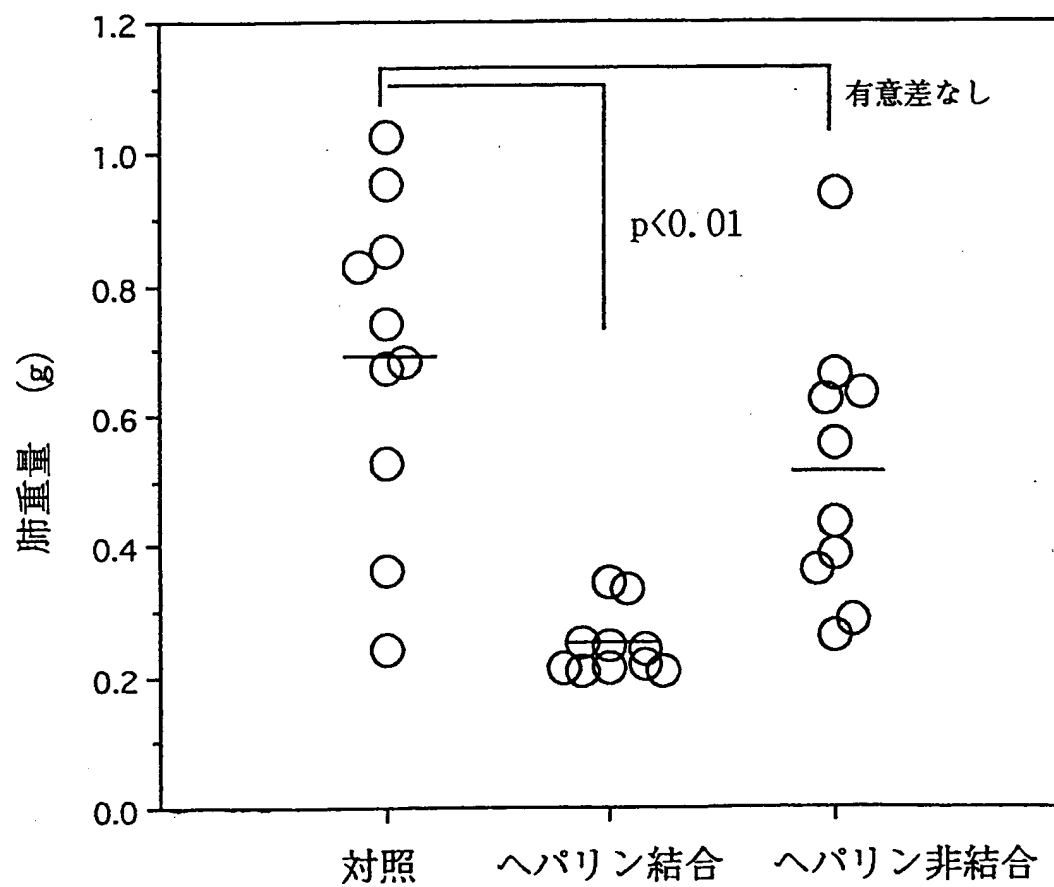


図 9



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03635

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1<sup>6</sup> C12P21/00, A61K38/01

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1<sup>6</sup> C12P21/00, A61K38/01

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSYS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIJNEN, H.R., et al. "Characterization of the interaction between plasminogen and staphylokinase", European Journal of Biochemistry (1994), Vol. 224, No. 1, pages 143-149	1 - 7
A	GISSLER, H.M., et al. "Enhanced association of plasminogen/plasmin with lesional epidermis of bullous pemphigoid", British Journal of Dermatology (1992), Vol. 127, No. 3, pages 272-277	1 - 7
A	HOLVOET, P., et al. "A monoclonal antibody directed against the high-affinity lysine-binding site (LBS) of human plasminogen", European Journal of Biochemistry (1986), Vol. 157, No. 1, pages 65-69	1 - 7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

December 8, 1997 (08. 12. 97)

Date of mailing of the international search report

December 16, 1997 (16. 12. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03635

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIJNEN, H.R., et al. "Characterization of the high-affinity interaction between human plasminogen and pro-urokinase", European Journal of Biochemistry (1985), Vol. 150, No. 1, pages 141-144	1 - 7
A	Lijnen, H.R., et al. "Isolation and Characterization of a Human Plasma Protein with Affinity for the Lysine Binding Sites in Plasminogen", The Journal of Biological Chemistry (1980), Vol. 255, No. 21, pages 10214-10222	1 - 7



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>1</sup> C12P21/00, A61K38/01

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>1</sup> C12P21/00, A61K38/01

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
BIOSYS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	LIJNEN, H. R., et. al. "Characterization of the interaction between plasminogen and staphylokinase", European Journal of Biochemistry(1994), Vol. 224, No. 1, pages 143-149	1-7
A	GISSLER, H. M., et. al. "Enhanced association of plasminogen/plasmin with lesional epidermis of bullous pemphigoid", British Journal of Dermatology (1992), Vol. 127, No. 3, pages 272-277	1-7
A	HOLVOET, P., et. al. "A monoclonal antibody directed against the high-affinity lysine-binding site (LBS) of human plasminogen", European Journal of Biochemistry(1986), Vol. 157, No. 1, pages 65-69	1-7
A	LIJNEN, H. R., et. al. "Characterization of the high-affinity interaction	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.12.97

国際調査報告の発送日

16.12.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
村上 騎見高



4B 8827

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	between human plasminogen and pro-urokinase", European Journal of Biochemistry(1985), Vol.150, No.1, pages 141-144  Lijnen, H.R., et.al."Isolation and Characterization of a Human Plasma Protein with Affinity for the Lysine Binding Sites in Plasminogen", The Journal of Biological Chemistry(1980), Vol.255, No.21, pages 10214-10222	1 - 7